

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 1 日
Date of Application:

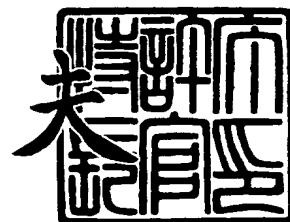
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 8 1 3 6
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 8 1 3 6]

出 願 人 三 菱 レ イ ヨ ン 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 9 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J10599A1

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成15年 4月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61H 33/02

【発明の名称】 高濃度炭酸温水浴による血管新生療法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号 三菱レイヨン株式会
社内

【氏名】 榊原 巨規

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区砂田橋四丁目 1 番 6 0 号 三菱レイ
ヨン株式会社商品開発研究所内

【氏名】 大谷内 健

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市緑丘 3 - 1 4 - 1

【氏名】 松原 弘明

【特許出願人】

【識別番号】 000006035

【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064908

【弁理士】

【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】 100108578

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 詔男

【選任した代理人】

【識別番号】 100089037

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101465

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】 100094400

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】 100107836

【弁理士】

【氏名又は名称】 西 和哉

【選任した代理人】

【識別番号】 100108453

【弁理士】

【氏名又は名称】 村山 靖彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706795

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高濃度炭酸温水浴による血管新生療法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 二酸化炭素濃度が 7 0 0 p p m 以上であり、水温が 3 3 ～ 4 2 ℃である炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の新生血管数を増加させることを特徴とする血管新生療法。

【請求項 2】 二酸化炭素濃度が 7 0 0 p p m 以上であり、水温が 3 3 ～ 4 2 ℃である炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の組織中の血管内皮細胞数を 1 . 5 倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法。

【請求項 3】 二酸化炭素濃度が 7 0 0 p p m 以上であり、水温が 3 3 ～ 4 2 ℃である炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の末梢血液中の血管内皮前駆細胞数を 1 . 1 倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法。

【請求項 4】 経皮的に吸収された二酸化炭素の血管拡張作用により組織血流量を増加させること、および／または前記疾患部位の組織中体液の p H を局所的に酸性側に移行させて血管成長因子を誘発させることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の血管新生療法。

【請求項 5】 前記炭酸温水への末梢血管疾患部位の浸漬は、1 回の浸漬時間が 1 0 分間以上であり、かつ 2 4 時間に 1 回以上の頻度で断続的に実施されるものであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の血管新生療法。

【請求項 6】 前記疾患部位を前記炭酸温水へ浸漬する前に、前記炭酸温水に殺菌剤が溶解されていることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の血管新生療法。

【請求項 7】 前記末梢血管疾患部位が潰瘍を伴うものであって、該潰瘍部位に二酸化炭素透過性フィルムが添付された状態で、前記疾患部位を前記炭酸水に浸漬することを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の血管新生療法。

【請求項 8】 前記末梢血管疾患部位が足部に存在し、該疾患が下肢の疼痛を伴うものであって、少なくとも膝関節から前記疾患部位までの範囲にわたる部

位を前記炭酸温水へ浸漬することを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の血管新生療法。

【請求項 9】 細胞増殖因子の直接投与、細胞増殖因子発現遺伝子の導入、および骨髓単核球細胞の移植から選ばれるいずれか 1 種以上の血管新生療法を併用して実施することを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の血管新生療法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高濃度炭酸温水浴による血管新生療法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

炭酸泉は、その強力な血管拡張作用により末梢血液循環不全に優れた効果を発揮すると考えられていることから、広く治療や湯治に使用されている。これまで天然より湧出した炭酸泉が使用されていたが、優れた人工炭酸泉製造方法の開発により、現在では広く内科治療の一つとして人工炭酸泉治療が使用されるに至っている。このような二酸化炭素の血管拡張作用は、以下のような機構により起こると考えられている。

【 0 0 0 3 】

生体内の物質代謝によって得られるエネルギーは、筋肉や臓器において消費されるが、その際の直接のエネルギーは A T P （アデノシン 3 リン酸）が A D P （アデノシン 2 リン酸）に変換される際に発生する熱エネルギーである。一方、糖（グリコーゲン）は、ピルビン酸、T C A 回路を経て酸化され、この時発生するエネルギーが変換された A D P を A T P にふたたび回復する際のエネルギー源として使用されている。糖が酸化される際には酸素が消費されると同時に、代謝産物として H₂O と炭酸ガスが放出され、血液によって肺から呼気として生体外に排出される。

生体内では、これらの必要とされるエネルギーを安定して供給するようにさまざまな調節機構が備えられているが、特に重要な調節機構が、代謝に必要な物質

の輸送路である血流量の調節である。血液および組織中における炭酸ガス量は、このような血流量の調節機構にさまざまな形で影響を与えている。通常、炭酸ガス量の増大は代謝の亢進（エネルギーの大量消費）を意味し、これを補うためにいくつかの調節機構により血管の拡張、すなわち血流量の増加をもたらし、酸素の供給と炭酸ガスの排出を促進するのである。

【 0 0 0 4 】

炭酸ガスは経皮的な吸収が容易なガスであることから、炭酸水浴によって経皮的に炭酸ガスを吸収し、本来代謝の最終産物である炭酸ガスを組織中に作為的に増大させ、血管の拡張と血流量の増大を行わせることが可能である。この作用により、一時的に血管を拡張させ、あるいは機能不全となっている微小血管を再び開通させて血流量を増大または末梢組織への血液流入をさせ、症状の緩和を図る手法が広く炭酸泉療法として活用されているものである。

しかし、炭酸浴による血管拡張作用は数分で消失する。したがって、上記の治療法は、炭酸ガスによる一時的な血管拡張作用と血流増加を利用したものであり、一時的な温熱療法と併用した疼痛の緩和や、血流増加による創傷部位への補助的治療、あるいは末梢血管の拡張による血圧低下（血管抵抗の軽減）を利用した心臓疾患のリスク軽減とリハビリテーションにその応用が限定されている。

また、炭酸ガス以外にも、プロスタグランジン E 1 などの生体内における血管拡張物質の投与により同様の効果を得る治療手段もあり、投与量により血管拡張作用を持続することができるが、血行障害そのものを治癒することはできない。

【 0 0 0 5 】

一方、動脈硬化や糖尿病などによる重症の末梢循環疾患の中には、血管そのものが本来の機能を非可逆的に消失し、もはや血管拡張物質の投与が意味をなさない症例が多く、一時的な血流量増加ではなく失われた血管そのものを再生し得る治療法が望まれている。

生体内においては血管の損傷や血行不全が起こった際にそれを修復する機能が備えられている。それは、いくつかの組織成長因子によってプロモートされており、現在、HGF（肝細胞成長因子）、VEGF（血管内皮細胞成長因子）、FGF（繊維芽細胞成長因子）などのたんぱく質やそれらの遺伝子を、直接疾患部

位に注入し血管の再生を促す治療法が研究されている。また、血管内皮前駆細胞と前記成長因子を分泌する骨髄単核球細胞を骨髄より採取し、精製して患部に移植する治療法も考案されている（例えば非特許文献 1、2 参照）。

【0006】

しかし、これらの治療法に必要な成長因子や遺伝子を直接患部に投与するには、生体内で微量にしか存在しない成長因子を捕集・濃縮したりあるいはその発現遺伝子を合成してウィルスなどのベクターに導入して製剤化する必要がある。さらに、患部への投与については、高濃度の成長因子を注射等により一般的には数十箇所に分けて患部に注射する必要がある。また、それらの成長因子は生体内では血管の再生以外の作用も想定されるため、その副作用が皆無ではない。注射によって投与された高濃度の成長因子が血液中にのって全身に拡散した場合には全身に影響を及ぼす可能性もある。

【0007】

【非特許文献 1】

タテিশーユヤマ、マツバラ、ムロハラ、イケダ、シントニ、マサキ、キシモト、ヨシモト、アカシ、シマダ、イワサカ、イマイズミ (Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T.)、Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial.、ランセット (Lancet) 2002 年、第 360 巻、427-435 頁。

【非特許文献 2】

イバ、マツバラ、ノザワ、フジヤマ、アマノ、モリ、コジマ、イワサカ (Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, Kojima H, Iwasaka T)、Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs.、サーキュレーション (Circulation) 2002 年、第 106 巻、2019-2025 頁。

【0008】

本発明は、かかる従来技術の問題点に鑑みてなされたものであり、末梢血管疾

患部位の血流量を増加させるのみではなく、低下または消失した血管の機能を新生しうる治療方法であり、人体に対する安全性が高く、実施が容易である治療方法を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、高濃度の二酸化炭素を含有する炭酸温수에、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、上記課題を解決することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の第一の発明は、二酸化炭素濃度が700ppm以上であり、水温が33～42℃である炭酸温수에、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、新生血管数を増加させることを特徴とする血管新生療法である。

本発明の第二の発明は、二酸化炭素濃度が700ppm以上であり、水温が33～42℃である炭酸温수에、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、疾患部位組織中の血管内皮細胞数を1.5倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法である。

また、本発明の第三の発明は、二酸化炭素濃度が700ppm以上であり、水温が33～42℃である炭酸温수에、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、末梢血液中の血管内皮前駆細胞数を1.1倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法である。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の方法に用いられる炭酸温水中の二酸化炭素濃度は、700ppm以上である。

炭酸温水浴による炭酸ガスの経皮吸収量は、炭酸温水中に溶解する炭酸ガスの濃度に比例して増加する。単に創傷部位への適応や温熱療法の補助療法である場合には、炭酸ガスは皮膚表面近傍に作用させれば良いため、炭酸ガスの有効最低濃度は、健常人の場合で400ppm程度である。

しかしながら、本発明の血管新生療法においては、炭酸ガスをより組織の深部

に到達させることが必要となるため、より高濃度であることが必要となり、700 ppm以上の濃度とされる。二酸化炭素濃度が700 ppmより低いと、血管拡張作用はあるが、血管新生作用が得られない。さらに、二酸化炭素の濃度は、1000～1400 ppmであることが好ましい。二酸化炭素濃度が上記範囲内であると、十分な血管新生の効果が得られ、かつ皮膚や組織への過度の刺激を与えないため好ましい。

【0011】

上記のような二酸化炭素濃度を達成するための手段は特に限定されないが、例えば、化学反応により炭酸ガス気泡を温水中に発生、溶解させる方法、炭酸ガスを封入した圧力タンク中に温水を導入して炭酸ガスを溶解する方法（例えばTrautwein社製、型式AM2100を用いて炭酸温水を製造）、ガス透過性中空糸膜に温水および炭酸ガスを導入して炭酸ガスを溶解する方法（例えば三菱レイヨン・エンジニアリング社製、型式MRE-SPA-MDを用いて炭酸温水を製造）等が挙げられる。これらのうち、1000 ppm以上の炭酸ガス濃度の炭酸温水を簡便かつ正確な濃度で製造できる点から、ガス透過性中空糸膜に温水および炭酸ガスを導入して炭酸ガスを溶解する方法による炭酸温水製造装置を使用するのが好ましい。

また、大気圧下での炭酸ガスの温水中への飽和溶解濃度は33℃～42℃で1150 ppm～950 ppmであるが炭酸ガスの生理作用は個体差や疾患にもよるが約1400 ppmまでは濃度依存的に増強される。大気圧下では過飽和に溶解した二酸化炭素は飽和濃度にまで容易に低下するため、常に過飽和の濃度を維持する目的で、実施中に継続的に温水中に炭酸ガスを補充することがより好ましい。

【0012】

本発明の方法に用いられる炭酸温水の水温は、33～42℃であり、より好ましくは、体温に近い35℃～39℃である。水温が33℃より低いと、血管新生作用を十分に得ることができず、また、患者が炭酸水を冷たく感じるため必要な時間患部を浸漬することが困難になる。また、水温が42℃より高いと、過度に代謝が亢進されて組織の再生に悪影響を与えたり、患者が炭酸水を熱く感じるため必要な時間患部を浸漬することが困難になる。

【0013】

本明細書において、末梢血管疾患部位とは、末梢血管疾患により組織に血液が十分に供給されていない部位、および／または虚血により末梢血管の機能が低下若しくは消失している部位をいう。

本発明の血管新生療法を好適に用いることができる末梢血管疾患としては、動脈硬化や血栓等による虚血性疾患や、糖尿病による末梢循環障害による疾患、バージャー病、レイノー病、膠原病等による末梢血管の循環障害等が挙げられる。

末梢血管疾患部位は、特に限定されないが、一般的に上肢、下肢等に疾患部位を有する場合が多い。これらのうち、膝下部、足部に疾患を有する場合が最も多く、有効な治療法も無いので、特に本発明の血管新生療法を好適に用いることができる。

【0014】

本発明の第一の発明は、前記炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の新生血管数を増加させることを特徴とする血管新生療法である。

上述のように、動脈硬化や糖尿病などによる重症の末梢循環疾患の中には、血管そのものが本来の機能を非可逆的に消失し、もはや血管拡張物質の投与が意味をなさない症例が多く、一時的な血流量増加ではなく失われた血管そのものを再生し得る治療法が望まれている。本発明の方法は、簡易な方法により、血流増加作用のみではなく、新生血管数を増加させることができるため、非常に優れたものである。

疾患部位の新生血管数の増加は、以下のようにして測定することができる。

本発明による新生血管数の増加は経皮的に吸収された炭酸ガスの作用によるものであり、特に皮膚近傍に強く発現するものであるから、皮膚近傍の微小血管の血流量を測定するレーザードップラー血流量計による組織血流量測定で確認することが可能である。また、生体への侵襲はあるが、造影剤を注入することによるX線血管造影や、組織を採取して、血管から血液中に分泌される酵素であるアルカリフォスファターゼ（ALP）をマーカーとして染色し、同定することにより、血流のある血管数を測定し、筋繊維数に対する血流のある血管数の比率を求める

ことによっても、疾患部位の組織中の生存血管数の増加を確認することができる。

【0015】

本発明の第二の発明は、前記炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位組織中の血管内皮細胞数を1.5倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法である。血管内皮細胞数は多いほど血管の新生が多いことを示すので、2.0倍以上であることがさらに好ましい。

ここで、血管内皮細胞と特異的に結合しているフォンブランダント因子(vWF)をマーカーとして免疫染色し、疾患部位の組織の筋繊維数に対する血管内皮細胞数の比率を測定することによって、血管を構成する血管内皮細胞数の増加を確認することができる。

【0016】

本発明の第三の発明は、前記炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の末梢血液中の血管内皮前駆細胞数を1.1倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法である。血管内皮前駆細胞数は、多いほど血管の新生能（血管内皮細胞への分化と血管形成）が強いことを示すので、1.2倍以上に増加させることがさらに好ましい。

ここで、末梢血液とは、心臓から遠位置にある血管を流れる血液を意味する。また、血管内皮前駆細胞とは、幹細胞の中でも血管内皮細胞に分化するものであり血管新生に不可欠な細胞である。

疾患部位の血管内皮前駆細胞は、末梢血液中の単核球細胞(Peripheral blood mononuclear cells/PBMnC)から分化するものであり、単核球細胞とlectinとの結合能と、単核球細胞へのDil-Acetylated-Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL)の取り込みとを指標としてマッピングするフローサイトメトリー解析(FACS)において、マップの一部領域に現れることが確認されている。従って、その領域にある単核球細胞の存在比率を測定することにより、血管内皮前駆細胞数の増加を確認することができる。

【0017】

本発明の血管新生療法は、さらに好ましくは、経皮的に吸収された二酸化炭素

の血管拡張作用により組織血流量を増加させること、および／または疾患部位の組織中体液の pH を局所的に酸性側に移行させて血管成長因子を誘発させることを特徴とする。

高濃度の二酸化炭素を含有する炭酸温水に疾患部位を浸漬すると、経皮的に炭酸ガスが吸収され、組織中の二酸化炭素濃度が増大する。従って、上述のように、生体内の調節機構により、血管拡張が起こり、組織血流量を増大させることができる。

また、吸収された炭酸ガスは、徐々に皮下組織内部に到達して、さらに、残存している血管内皮細胞に到達する。この炭酸ガスの直接刺激により、内皮細胞より血管成長因子が放出される。さらに、吸収された炭酸ガスは、組織中体液の中で炭酸イオンにイオン解離して組織を酸性側に移行させることによって、血管成長因子の放出を促進する。

【0018】

本発明の方法においては、前記炭酸温水への末梢血管疾患部位の浸漬は、1 回の浸漬時間が 10 分間以上であり、かつ 24 時間に 1 回以上の頻度で断続的に実施されることが好ましい。

本発明の血管新生療法は、細胞に対する炭酸ガスの刺激による療法であるため、長期にわたり断続的に実施することが好ましい。炭酸ガスの作用をより深部に到達させるためには、少なくとも 1 回の実施につき浸漬時間が 10 分間以上であることが好ましい。さらに、1 回の浸漬時間が 10～30 分間の範囲内であると、十分な効果が得られ、かつ患者に対する負担が大きくなり過ぎないため好ましい。

浸漬の頻度は、少なくとも 24 時間に 1 回以上実施することが好ましい。さらに、浸漬頻度が 24 時間に 1～2 回であると、十分な効果が得られ、かつ患者に対する負担が大きくなり過ぎないため好ましい。

【0019】

上記末梢血管疾患部位が、潰瘍を伴うものである場合には、疾患部位を炭酸温水へ浸漬する前に、炭酸温水に殺菌剤を溶解させることが好ましい。

末梢血管疾患患者は、患部に潰瘍を発生していることが多い。従って、炭酸温

水浴を実施する際に、水浴中の細菌による感染の懸念があるため、殺菌剤を溶解させた炭酸温水に患部を浸漬させることが好ましい。殺菌剤としては、炭酸水をアルカリ性にさせないものであり、なおかつ皮膚への刺激の少ないのもであれば良い。例えば、グルコン酸クロロヘキシジン、ポビドンヨード、ジクロロシアヌル酸塩、次亜塩素酸塩等が挙げられる。

【0020】

また、上記末梢血管疾患部位が、潰瘍を伴うものである場合には、潰瘍部位に二酸化炭素透過性フィルムを添付した状態で、疾患部位を炭酸温水へ浸漬することが好ましい。

上述のように、細菌による感染の危険性を低減させるために、炭酸温水に殺菌剤を溶解させることも好ましいが、殺菌剤の中には細胞の増殖を阻害する作用を持つものもあるため、治療効果を減少させる場合もある。

本発明においては、炭酸温水浴により炭酸ガスを経皮的に吸収させることが重要であるため、細菌の通過を阻止するが二酸化炭素透過性を有するフィルムを患部に添付することにより、細菌感染を防止しつつ炭酸ガスの効果を減少させることなく実施することが可能となる。このような二酸化炭素透過性フィルムとしては、例えば、フィルムドレッシング材（3M社製：商品名テガダーム、スミスアンドネフュー社製：商品名オプサイト 等）やガス透過性の高いシリコン薄膜等が挙げられる。

炭酸温水に殺菌剤を溶解させることと、疾患部位に二酸化炭素透過性フィルムを添付することとは、それぞれ単独に行ってもよいが、2種を組み合わせてもよい。

【0021】

末梢血管疾患部位が足部に存在し、該疾患が下肢の疼痛を伴うものである場合には、少なくとも膝関節から前記疾患部位までの範囲にわたる部位を前記炭酸温水に浸漬することが好ましい。

炭酸温水浴は、通常自覚症状のある足部の疾患部位においてのみ実施されるが、本発明の血管新生療法を適用するに好ましい動脈血管が多く存在するのは筋肉組織であるため、膝関節から足部の間に存在する筋肉の部位が炭酸温水に浸漬さ

れるようにして実施することが好ましい。

【0022】

本発明の血管新生療法は、細胞増殖因子の直接投与、細胞増殖因子発現遺伝子の導入、および骨髄単核球細胞の移植から選ばれるいずれか1種以上の血管新生療法（以下、「他の血管新生療法」ということがある。）を併用して実施することが好ましい。

上述したように、現在、HGF（肝細胞成長因子）、VEGF（血管内皮細胞成長因子）、FGF（繊維芽細胞成長因子）などの細胞増殖因子やそれらの発現遺伝子を、直接疾患部位に注入し血管の再生を促す治療法が研究されている。また、血管内皮前駆細胞と前記成長因子とを分泌する骨髄単核球細胞を骨髄より採取し、精製して患部に移植する治療法も考案されている。

これらのような細胞増殖因子の直接投与、細胞増殖因子発現遺伝子の導入、骨髄単核球細胞の移植等による血管新生療法は、再生した血管を維持するためには、断続的に該療法を実施することが望ましいが、投与する作用物質を得ることが困難であると共に、投与に際して患者に与える負荷が大きいため、反復して実施することができない。

【0023】

しかしながら、これら他の血管新生療法と本発明による方法とを同時期に、または他の血管新生療法を実施した後に、本発明による方法を続けて実施することにより、断続的に他の血管新生療法を実施することなく、長期にわたって血管の機能を保持することが可能となる。特に、骨髄単核球細胞の移植による血管新生療法は一時的な効果は高く、特別な製剤を必要としないため実施しやすく好ましいが、患者本人の骨髄から作用物質を得るため患者への負荷も大きいため、骨髄単核球細胞の移植実施終了後から、本発明の療法を継続して実施することが好ましい。

【0024】

本発明の血管新生作用は、血管を流れる血液中の炭酸ガス濃度の上昇で引き起こされると考えられる。通常、血液中の炭酸ガス濃度を意図的に上昇させようとすると、全身の血液中の炭酸ガス濃度を同時に上昇させることになり危険を伴

う。しかしながら、本発明の炭酸温水浴は、疾患部位に対して局所的であり、さらに血管組織の外側から作用させる。従って、作用させる炭酸ガスの絶対量は少なくてもすみ、また、過剰の炭酸ガスはすみやかに呼気より排出されるため、全身の血液中の炭酸ガス濃度を過剰に上昇させることはなくきわめて安全である。また、炭酸ガスは本来生体内に広く存在している物質であることから、特段の副作用もないと思われる。

このように、本発明の高濃度炭酸温水浴による血管新生療法は、人体に対して安全性が高いものであり、また、特段の大掛りな装置、設備を必要とせずに簡便に行うことができるものである。

【0025】

【実施例】

以下本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】

[虚血モデルマウスの作成、炭酸温水への浸漬]

6週齢のマウス（C57BL/6J）オスの、左大腿動脈および大腿静脈を結紮し、下肢虚血モデルマウスを作成した。

炭酸水群としては、虚血モデルマウスを用い、血管結紮後4日目より、二酸化炭素濃度が1100ppmである炭酸温水（37℃）に、10分間、マウスの両足を浸漬した。浸漬は、1日に1回、モデル作成後28日目まで行った。対照群としては、炭酸を含まない蒸留水（37℃）を用いたほかは炭酸水群と同様にして、虚血モデルマウスの両足を温水へ浸漬した。

上記炭酸水群および対照群について、以下の効果の確認を行った。

【0027】

[1] 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢の血流改善効果

本実施例では、虚血モデルマウスの下肢血流を測定した。レーザードップラーパーフュージョンイメージアナライザー（Moor Instruments社製）を用いて、モデル作成直後、ならびに3, 7, 14, 21, 28日後の、炭酸水群および対照群の下肢血流を測定した。

この結果を図1に示した。定量化は、虚血を行っていない健康側下肢の血流を測定し、これに対する虚血側下肢の血流量比を示すことによって行った。

図1に示したように、7日後から炭酸水群にて虚血側下肢の有意な血流回復が観察された。28日後には対照群と比較して約1.9倍もの有意な血流量増加が見られた。

【0028】

[2] 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢骨格筋での新生血管数の増加

本実施例では、モデル作成後28日目におけるマウスの心臓から造影剤（リビオドール）を注入し、下肢血管を造影した。血管造影像の観察により、炭酸水群では対照群に比較して、顕著な側副血管の増加が認められた。また、マウス下肢骨格筋組織をALP染色し、筋繊維に対する新生血管数を測定した。この結果を図2に示す。

血管数は、炭酸水群において対照群よりも約5.5倍増加しており、炭酸水群では有意に新生血管数が増加していることがわかった。

【0029】

[3] 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢骨格筋での血管内皮細胞数の増加

本実施例では、モデル作成後28日目におけるマウス下肢骨格筋組織を血管内皮に特異的なvWF因子抗体を用いて免疫染色し、筋繊維に対する血管内皮細胞数を測定した。結果を図3に示す。

血管内皮細胞数は、炭酸水群において対照群よりも約3.1倍に増加しており、炭酸水群では有意に血管新生が促進されていることがわかった。

【0030】

[4] 炭酸温水浴によるマウス末梢血中の血管内皮前駆細胞数の増加

本実施例では、モデル作成後28日目におけるマウス末梢血の単核球細胞(Peripheral blood mononuclear cells/PBMnC)をlectinとの結合能およびDil-Acetylated-Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL)の取り込みを指標としたフローサイトメトリー解析(FACS)を行い、単核球細胞における血管内皮前駆細胞数を測定した。結果を図4に示す。

血管内皮前駆細胞数は、炭酸水群は対照群に対して約1.4倍に増加しており

、炭酸水群では有意に血管新生が促進されていることがわかった。

【 0 0 3 1 】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の血管新生療法は、末梢血管疾患部位の血流量を増加させるのみではなく、失われた血管の機能を新生させることができる。さらに、本発明の方法は、人体に対する安全性が高く、かつ容易に実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢の血流改善効果を示すグラフである。

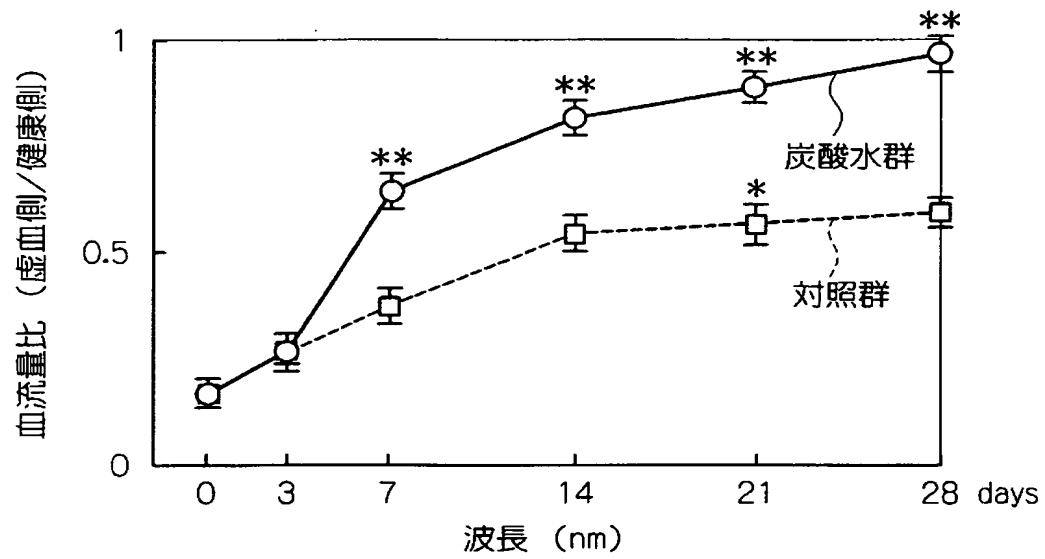
【図 2】 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢骨格筋での新生血管数の増加を示すグラフである。

【図 3】 炭酸温水浴によるマウス虚血下肢骨格筋での血管内皮細胞数の増加を示すグラフである。

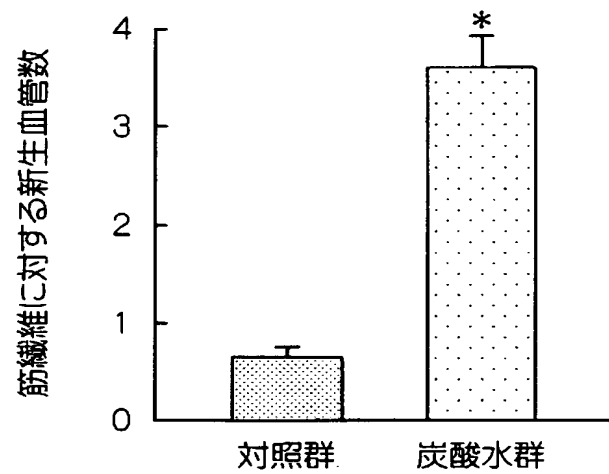
【図 4】 炭酸温水浴によるマウス末梢血液中の血管内皮前駆細胞数の増加を示すグラフである。

【書類名】 図面

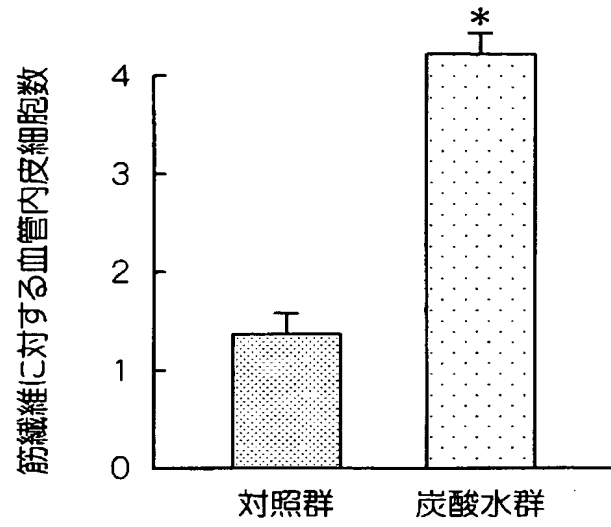
【図 1】



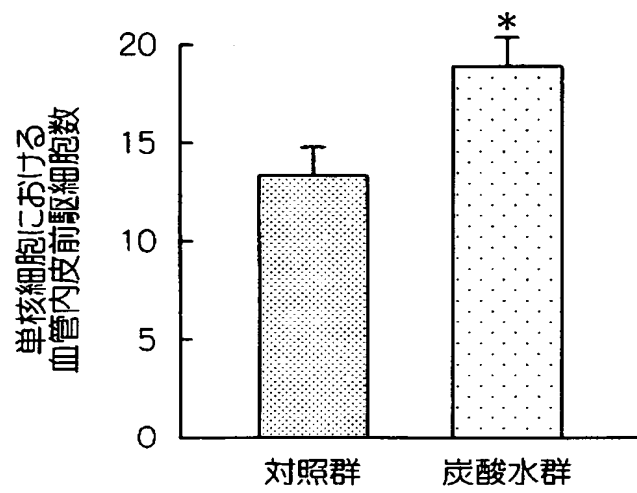
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 末梢血管疾患部位の血管を新生することができ、人体に対する安全性が高く、実施が容易である治療方法を提供すること。

【解決手段】 二酸化炭素濃度が700ppm以上であり、水温が33～42℃である炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の新生血管数を増加させることを特徴とする血管新生療法。前記炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位組織中の血管内皮細胞数を1.5倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法。前記炭酸温水に、末梢血管疾患部位を浸漬することにより、該疾患部位の末梢血液中の血管内皮前駆細胞数を1.1倍以上に増加させることを特徴とする血管新生療法。

【選択図】 図2

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 9 8 1 3 6
受付番号	5 0 3 0 0 5 4 2 9 5 9
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0 0 9 3
作成日	平成 1 5 年 5 月 1 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	000006035
【住所又は居所】	東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号
【氏名又は名称】	三菱レイヨン株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100064908
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】	100108578
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	高橋 詔男

【選任した代理人】

【識別番号】	100089037
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	渡邊 隆

【選任した代理人】

【識別番号】	100101465
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】	100094400
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ ル 志賀国際特許事務所

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】 鈴木 三義
【選任した代理人】
【識別番号】 100107836
【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ
ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】 西 和哉
【選任した代理人】
【識別番号】 100108453
【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 O R ビ
ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】 村山 靖彦

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 9 8 1 3 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 0 3 5]

1 . 変更年月日

1 9 9 8 年 4 月 2 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号

氏 名

三菱レイヨン株式会社